



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111349144 A

(43)申请公布日 2020.06.30

(21)申请号 201811581394.9

G01N 33/68(2006.01)

(22)申请日 2018.12.24

(71)申请人 天津农学院

地址 300384 天津市西青区津静路22号(津
沪高速收费站西侧500米)

(72)发明人 赵瑞利 金天明 杨琳燕 姜轩
马吉飞 李留安 秦顺义 李存
付超 胡烨

(74)专利代理机构 石家庄轻拓知识产权代理事
务所(普通合伙) 13128

代理人 王璐

(51)Int.Cl.

C07K 7/06(2006.01)

C07K 1/14(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

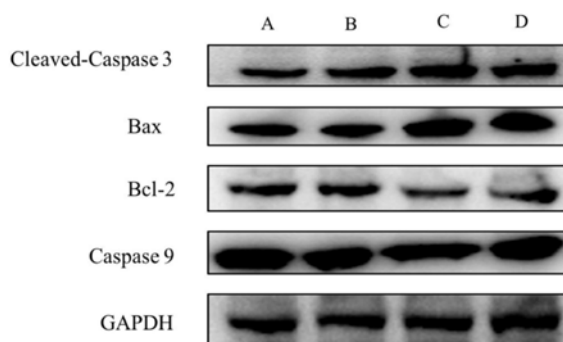
权利要求书2页 说明书5页 附图6页

(54)发明名称

一种在牛蛙中提取抗肿瘤多肽及分析方法

(57)摘要

本发明涉及生物提取技术领域,尤其涉及一种在牛蛙中提取抗肿瘤多肽及分析方法。本申请方案通过牛蛙皮肤cDNA文库中筛选的Temporin-La(T-La)抗肿瘤肽,通过检测发现T-La具有一定的抗肿瘤活性和轻微溶血性。为提高其对肿瘤细胞的靶向性,对牛蛙抗肿瘤肽T-La氨基酸进行分子改造,合成新的抗肿瘤肽T-La(FS),并对改造后的多肽T-La(FS)与RGD偶联,合成对肿瘤细胞具有靶向作用的抗肿瘤肽RGD-T-La(FS),通过对其生物信息学进行分析及生物活性检测,前期研究证明RGD-T-La(FS)对肿瘤细胞具有较强的抑制作用。



1. 一种在牛蛙中提取抗肿瘤多肽及分析方法,包括小鼠黑色素瘤B16细胞、多肽样品T-La(S):LLRHVVKILSKYL-NH₂;RGD-T-La(S):RGDLLRHVVKILSKYL-NH₂;T-La(FS):FLRHVVKILSKYL-NH₂;RGD-T-La(FS):RGDFLRHVVKILSKYL-NH₂;CCK8检测试剂盒、RPMI1640细胞培养基、NP-40细胞裂解液、BCA蛋白浓度试剂盒、Triton X-100、左旋多巴L-DOPA、兔抗Cleaved-caspase 3、Bax、Bcl-2、caspase 9多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗及兔抗GAPDH多克隆抗,其特征在于:

步骤一:取生长状态最佳的B16细胞常规方法消化成单细胞悬液,将细胞密度调整到 $7 \times 10^4 \sim 9 \times 10^4$ 个/mL时以每孔2 mL接种于6孔板中,置于37℃、5%CO₂中培养24 h后PBS洗涤一次换液,分别加入不同浓度的多肽样品T-La(S):LLRHVVKILSKYL-NH₂;RGD-T-La(S):RGDLLRHVVKILSKYL-NH₂;T-La(FS):FLRHVVKILSKYL-NH₂;RGD-T-La(FS):RGDFLRHVVKILSKYL-NH₂至单细胞悬液中;将单细胞悬液最终浓度设置为5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL,并设立对照组;多肽样品作用24 h后收获细胞,消化细胞后将细胞悬浮离心,PBS洗涤两次,加入1 mol/L的NaOH,置于80℃水浴30 min至细胞团块完全溶解,再加入超纯水将NaOH终浓度稀释至0.2 mol/L;混合均匀后取各组溶液至96孔板中,每孔100 μL,每组设立8个重孔;用酶标仪在490 nm处测定每孔OD值,从而测定黑色素含量,其计算方法为黑色素含量(%)=(OD实验组/OD对照组)×100%;

步骤二:取生长状态最佳的B16细胞常规方法消化成单细胞悬液,将细胞密度调整到 $7 \times 10^4 \sim 9 \times 10^4$ 个/mL时以每孔100 μL接种于96孔板中,置于37℃、5%CO₂中培养24 h后分别加入不同浓度的多肽样品T-La(S):LLRHVVKILSKYL-NH₂;RGD-T-La(S):RGDLLRHVVKILSKYL-NH₂;T-La(FS):FLRHVVKILSKYL-NH₂;RGD-T-La(FS):RGDFLRHVVKILSKYL-NH₂至单细胞悬液,将单细胞悬液最终浓度设置为5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL,并设立对照组,终体积为200 μL,并且每组设置4个重复对照组;药物作用24 h弃上清液,用PBS洗涤,每孔加入1% Triton X-100溶液100 μL,手动平稳震荡5 min,移至-20℃冰箱冻存1 h,室温融化使细胞裂解,37℃预温后每孔加入0.1%左旋多巴溶液100 μL,37℃孵育2 h,用酶标仪在490 nm测定OD值,从而测定酪氨酸酶活性激活率,其计算方法为酪氨酸酶活性激活率(%)=(OD实验组/OD对照组)×100%;

步骤三:取生长状态最佳的B16细胞常规方法消化成单细胞悬液,将细胞密度调整到 $7 \times 10^4 \sim 9 \times 10^4$ 个/mL时以每孔2 mL接种于6孔板中,单细胞悬液加入终浓度为20、50 μg/mL的多肽样品T-La(S):LLRHVVKILSKYL-NH₂;RGD-T-La(S):RGDLLRHVVKILSKYL-NH₂;T-La(FS):FLRHVVKILSKYL-NH₂;RGD-T-La(FS):RGDFLRHVVKILSKYL-NH₂,单细胞悬液作用24 h后弃培养液,用PBS洗涤2遍加入适当体积的NP-40细胞裂解液4℃裂解1 h,用细胞刮将细胞轻轻刮下吸入ep管中放入-80℃冰箱中或立即使用;取上述样品低温离心(12000 r/min,5 min),取上清,BCA法测总蛋白浓度,按照每个样品50 ng总蛋白加入上样缓冲液,煮沸后,进行15% SDS-PAGE电泳后,半干法转至PVDF膜,5%脱脂奶粉4℃孵育过夜,加入定量的兔抗Cleaved-caspase 3、Bax、Bcl-2、caspase 9多克隆抗体和GAPDH一抗,在室温孵育1.5 h;加入适量的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗,室温孵育1 h,ECL法发光显色;从而制备 RGD嵌合体肽;采用图像分析软件系统分析各条带的灰度值,用各目的蛋白的灰度值与GAPDH灰度值的比值进行分析;

步骤四:试验结果采用统计学软件SPSS Statistics 17 对数据进行处理,数据用平均

值±标准差表示,组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 认为两组间的差异具有统计学意义。

一种在牛蛙中提取抗肿瘤多肽及分析方法

[0001]

技术领域

[0002] 本发明属于生物提取技术领域,具体地说,本发明涉及一种在牛蛙中提取抗肿瘤多肽及分析方法。

背景技术

[0003] 蛙类细胞提取物以下简称蛙类提取物,尤其针对牛蛙细胞提取,基于靶向嵌合体肽,对小鼠黑色素瘤细胞B16F10的凋亡的影响及黑色素合成的作用机理,研究结果显示:靶向嵌合体肽对于在裸鼠和色素瘤B16F10模型中的靶向治疗作用效果明显;无论是腹腔注射还是灌胃都显著抑制裸小鼠Lewis肺癌的生长和转移,减少肿瘤组织微血管密度,下调促血管生成因子VEGF的表达;对裸小鼠黑色素瘤B16细胞的转移也有强抑制作用。

[0004] 靶向治疗作为抗肿瘤质量方向的目标,将药物效应尽量限定在特定靶细胞、组织或器官内,从而针对正常细胞、器官或者组织功能无影响,而靶向治疗的关键在于找寻或者改变特定蛋白对于肿瘤细胞的抑制活性。

[0005] 在现有技术中,为了提高蛋白的活性,针对蛋白的特异位点进行特异性的突变和取代,从而寻找活性更高的变体是常规的做法。为了进一步提高该蛋白的生物活性,申请人通过大量的实验,针对牛蛙提取突变体,从而获得了比蛙类提取物本身具有更高抑制活性的突变体。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题,是针对上述存在的技术不足,提供了一种在牛蛙中提取抗肿瘤多肽及分析方法,具体而言,本发明通过牛蛙皮肤cDNA文库中筛选的Temporin-La(T-La)抗肿瘤肽,通过检测发现T-La具有一定的抗肿瘤活性和轻微溶血性。为提高其对肿瘤细胞的靶向性,对牛蛙抗肿瘤肽T-La氨基酸进行分子改造,合成新的抗肿瘤肽T-La(FS),并对改造后的多肽T-La(FS)与RGD偶联,合成对肿瘤细胞具有靶向作用的抗肿瘤肽RGD-T-La(FS),通过对其生物信息学进行分析及生物活性检测,前期研究证明RGD-T-La(FS)对肿瘤细胞具有较强的抑制作用;本发明提取的突变体具有明细的抑制活性特点。

[0007] 为解决上述技术问题,本发明所采用的技术方案是:包括小鼠黑色素瘤B16细胞、多肽样品T-La(S):LLRHVVKILSKYL-NH₂;RGD-T-La(S):RGDLLRHVVKILSKYL-NH₂;T-La(FS):FLRHVVKILSKYL-NH₂;RGD-T-La(FS):RGDFLRHVVKILSKYL-NH₂;CCK8检测试剂盒、RPMI1640细胞培养基、NP-40细胞裂解液、BCA蛋白浓度试剂盒、Triton X-100、左旋多巴L-DOPA、兔抗Cleaved-caspase 3、Bax、Bcl-2、caspase 9多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗及兔抗GAPDH多克隆抗,步骤一:取生长状态最佳的B16细胞常规方法消化成单细胞悬液,将细胞密度调整到 $7 \times 10^4 \sim 9 \times 10^4$ 个/mL时以每孔2 mL接种于6孔板中,置于37℃、5%CO₂中培养24 h后PBS洗涤一次换液,分别加入不同浓度的多肽样品T-La(S):

LLRHVVVKILSKYL-NH₂;RGD-T-La (S):RGDLLRHVVVKILSKYL-NH₂;T-La (FS):FLRHVVVKILSKYL-NH₂;RGD-T-La (FS):RGDFLRHVVKILSKYL-NH₂至单细胞悬液中;将单细胞悬液最终浓度设置为5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL,并设立对照组。多肽样品作用24 h后收获细胞,消化细胞后将细胞悬浮离心,PBS洗涤两次,加入1 mol/L的NaOH,置于80℃水浴30 min至细胞团块完全溶解,再加入超纯水将NaOH终浓度稀释至0.2 mol/L。混合均匀后取各组溶液至96孔板中,每孔100 μL,每组设立8个重孔。用酶标仪在490 nm处测定每孔OD值,从而测定黑色素含量,其计算方法为黑色素含量(%)=(OD实验组/OD对照组)×100%;

步骤二:取生长状态最佳的B16细胞常规方法消化成单细胞悬液,将细胞密度调整到 $7 \times 10^4 \sim 9 \times 10^4$ 个/mL时以每孔100 μL接种于96孔板中,置于37℃、5%CO₂中培养24 h后分别加入不同浓度的多肽样品T-La (S):LLRHVVVKILSKYL-NH₂;RGD-T-La (S):RGDLLRHVVVKILSKYL-NH₂;T-La (FS):FLRHVVVKILSKYL-NH₂;RGD-T-La (FS):RGDFLRHVVKILSKYL-NH₂至单细胞悬液,将单细胞悬液最终浓度设置为5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL,并设立对照组,终体积为200 μL,并且每组设置4个重复对照组。药物作用24 h弃上清液,用PBS洗涤,每孔加入1% Triton X-100溶液100 μL,手动平稳震荡5 min,移至-20℃冰箱冻存1 h,室温融化使细胞裂解,37℃预温后每孔加入0.1%左旋多巴溶液100 μL,37℃孵育2 h,用酶标仪在490 nm测定OD值,从而测定酪氨酸酶活性激活率,其计算方法为酪氨酸酶活性激活率(%)=(OD实验组/OD对照组)×100%;

步骤三:取生长状态最佳的B16细胞常规方法消化成单细胞悬液,将细胞密度调整到 $7 \times 10^4 \sim 9 \times 10^4$ 个/mL时以每孔2 mL接种于6孔板中,单细胞悬液加入终浓度为20、50 μg/mL的多肽样品T-La (S):LLRHVVVKILSKYL-NH₂;RGD-T-La (S):RGDLLRHVVVKILSKYL-NH₂;T-La (FS):FLRHVVVKILSKYL-NH₂;RGD-T-La (FS):RGDFLRHVVKILSKYL-NH₂,单细胞悬液作用24 h后弃培养液,用PBS洗涤2遍加入适当体积的NP-40细胞裂解液4℃裂解1 h,用细胞刮将细胞轻轻刮下吸入ep管中放入-80℃冰箱中或立即使用。取上述样品低温离心(12000 r/min,5 min),取上清,BCA法测总蛋白浓度,按照每个样品50 ng总蛋白加入上样缓冲液,煮沸后,进行15% SDS-PAGE 电泳后,半干法转至PVDF膜,5%脱脂奶粉4℃孵育过夜,加入定量的兔抗Cleaved-caspase 3、Bax、Bcl-2、caspase 9多克隆抗体和GAPDH一抗,在室温孵育1.5 h;加入适量的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗,室温孵育1 h,ECL法发光显色;从而制备 RGD嵌合体肽。采用图像分析软件系统分析各条带的灰度值,用各目的蛋白的灰度值与GAPDH灰度值的比值进行分析;

步骤四:试验结果采用统计学软件SPSS Statistics 17 对数据进行处理,数据用平均值±标准差表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为两组间的差异具有统计学意义。

[0008] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:本发明的多肽可以通过多种本领域已知的方法纯化,探索改造过的RGD嵌合体肽对黑色素瘤B16细胞增殖和凋亡机制做进一步筛选分析,提高其对肿瘤细胞的靶向性,对牛蛙抗肿瘤肽T-La氨基酸进行分子改造,合成新的抗肿瘤肽T-La (FS),并对改造后的多肽T-La (FS)与RGD偶联,合成对肿瘤细胞具有靶向作用的抗肿瘤肽RGD-T-La (FS),通过对其生物信息学进行分析及生物活性检测,前期研究证明RGD-T-La (FS)对肿瘤细胞具有较强的抑制作用;为临床上抗肿瘤药物的开发与应用奠定科

学基础;本发明提取的突变体多肽广泛用于制备相应的药物,去用于抑制癌症。

附图说明

- [0009] 图1为不同浓度的多肽12h内对B16细胞的增殖影响分析图。
[0010] 图2为不同浓度的多肽24h内对B16细胞的增殖影响。
[0011] 图3为多肽 12 h内对B16细胞增殖抑制率的分析图。
[0012] 图4为多肽 24 h内对B16细胞增殖抑制率的分析图。
[0013] 图5为T-La (S) 和RGD-T-La (S) 对B16细胞黑色素合成的影响图。
[0014] 图6为T-La (FS) 和RGD-T-La (FS) 对B16细胞黑色素合成的影响图。
[0015] 图7为T-La (S) 和RGD-T-La (S) 对B16细胞酪氨酸酶活性的影响分析图。
[0016] 图8为T-La (FS) 和RGD-T-La (FS) 对B16细胞酪氨酸酶活性的影响分析图。
[0017] 图9为RGD嵌合体肽对黑色素瘤B16 细胞凋亡相关蛋白表达的影响图A。
[0018] 图10为RGD嵌合体肽对黑色素瘤B16细胞相关蛋白凋亡的影响图B。

具体实施方式

[0019] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚明了,下面结合具体实施方式并参照附图,对本发明进一步详细说明。应该理解,这些描述只是示例性的,而并非要限制本发明的范围。此外,在以下说明中,省略了对公知结构和技术的描述,以避免不必要地混淆本发明的概念。

[0020] 其具体实施方式如下:准备如下材料,小鼠黑色素瘤B16细胞(由中国科学院放射医学研究所提供)、多肽样品T-La (S):LLRHVVKILSKYL-NH₂;RGD-T-La (S):RGDLLRHVVKILSKYL-NH₂;T-La (FS):FLRHVVKILSKYL-NH₂;RGD-T-La (FS):RGDFLRHVVKILSKYL-NH₂(由浙江昂拓莱司生物技术有限公司合成);CCK8检测试剂盒(购自上海碧云天生物技术有限公司)、RPMI1640细胞培养基(购自美国HyClone公司)、NP-40细胞裂解液、BCA蛋白浓度试剂盒、Triton X-100(均购自北京索莱宝科技有限公司)、左旋多巴L-DOPA(购自阿拉丁试剂有限公司)、兔抗Cleaved-caspase 3、Bax、Bcl-2、caspase 9多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗及兔抗GAPDH多克隆抗均购自Abcam贸易有限公司、其他试剂均为分析纯。

[0021] 将小鼠黑色素瘤B16细胞放入RPMI1640细胞培养基中复苏培养,常规消化传代按5000/孔接种于96孔板中,每孔100 μ L,并将含有5% CO₂ 的37℃细胞培养箱中培养过夜,加入多肽样品T-La (S):LLRHVVKILSKYL-NH₂;RGD-T-La (S):RGDLLRHVVKILSKYL-NH₂;T-La (FS):FLRHVVKILSKYL-NH₂;RGD-T-La (FS):RGDFLRHVVKILSKYL-NH₂使其终浓度为200 μ g/mL、100 μ g/mL、50 μ g/mL、20 μ g/mL、10 μ g/mL、5 μ g/mL。每组设4个重复培养组设立对照组。将实验组和对照组分别置于细胞培养箱中分别培养12 h、24 h时每孔加入10 μ L CCK8,37℃孵育40 min,分别在490 nm和630 nm处读取每孔的吸光度(OD值),记录结果。

[0022] 取生长状态最佳的B16细胞常规方法消化成单细胞悬液,将细胞密度调整到 $7 \times 10^4 \sim 9 \times 10^4$ 个/mL时以每孔2 mL接种于6孔板中,置于37℃、5%CO₂中培养24 h后PBS洗涤一次换液,分别加入不同浓度的多肽样品T-La (S):LLRHVVKILSKYL-NH₂;RGD-T-La (S):RGDLLRHVVKILSKYL-NH₂;T-La (FS):FLRHVVKILSKYL-NH₂;RGD-T-La (FS):

RGDFLRHVVKILSKYL-NH₂至单细胞悬液中;将单细胞悬液最终浓度设置为5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL,并设立对照组。多肽样品作用24 h后收获细胞,消化细胞后将细胞悬浮离心,PBS洗涤两次,加入1 mol/L的NaOH,置于80℃水浴30 min至细胞团块完全溶解,再加入超纯水将NaOH终浓度稀释至0.2 mol/L。混合均匀后取各组溶液至96孔板中,每孔100 μL,每组设立8个重孔。用酶标仪在490 nm处测定每孔OD值,从而测定黑色素含量,其计算方法为黑色素含量(%)=(OD实验组/OD对照组)×100%,从而完成黑色素含量测定。

[0023] 取生长状态最佳的B16细胞常规方法消化成单细胞悬液,将细胞密度调整到 $7 \times 10^4 \sim 9 \times 10^4$ 个/mL时以每孔100 μL接种于96孔板中,置于37℃、5%CO₂中培养24 h后分别加入不同浓度的多肽样品T-La(S):LLRHVVKILSKYL-NH₂;RGD-T-La(S):RGDLLRHVVKILSKYL-NH₂;T-La(FS):FLRHVVKILSKYL-NH₂;RGD-T-La(FS):RGDFLRHVVKILSKYL-NH₂至单细胞悬液,将单细胞悬液最终浓度设置为5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL,并设立对照组,终体积为200 μL,并且每组设置4个重复对照组。药物作用24 h弃上清液,用PBS洗涤,每孔加入1% Triton X-100溶液100 μL,手动平稳震荡5 min,移至-20℃冰箱冻存1 h,室温融化使细胞裂解,37℃预温后每孔加入0.1%左旋多巴溶液100 μL,37℃孵育2 h,用酶标仪在490 nm测定OD值,从而测定酪氨酸酶活性激活率,其计算方法为酪氨酸酶活性激活率(%)=(OD实验组/OD对照组)×100%,从而完成酪氨酸酶活性测定。

取生长状态最佳的B16细胞常规方法消化成单细胞悬液,将细胞密度调整到 $7 \times 10^4 \sim 9 \times 10^4$ 个/mL时以每孔2 mL接种于6孔板中,单细胞悬液加入终浓度为20、50 μg/mL的多肽样品T-La(S):LLRHVVKILSKYL-NH₂;RGD-T-La(S):RGDLLRHVVKILSKYL-NH₂;T-La(FS):FLRHVVKILSKYL-NH₂;RGD-T-La(FS):RGDFLRHVVKILSKYL-NH₂,单细胞悬液作用24 h后弃培养液,用PBS洗涤2遍加入适当体积的NP-40细胞裂解液4℃裂解1 h,用细胞刮将细胞轻轻刮下吸入ep管中放入-80℃冰箱中或立即使用。取上述样品低温离心(12000 r/min,5 min),取上清,BCA法测总蛋白浓度,按照每个样品50 ng总蛋白加入上样缓冲液,煮沸后,进行15% SDS-PAGE电泳后,半干法转至PVDF膜,5%脱脂奶粉4℃孵育过夜,加入定量的兔抗Cleaved-caspase 3、Bax、Bcl-2、caspase 9多克隆抗体和GAPDH一抗,在室温孵育1.5 h;加入适量的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗,室温孵育1 h,ECL法发光显色;从而制备RGD嵌合体肽。采用图像分析软件系统分析各条带的灰度值,用各目的蛋白的灰度值与GAPDH灰度值的比值进行分析,通过Western blot法检测蛋白表达情况。

[0024] 试验结果采用统计学软件SPSS Statistics 17对数据进行处理,数据用平均值±标准差表示,组间比较采用单因素方差分析,P<0.05认为两组间的差异具有统计学意义。

[0025] RGD嵌合体肽抑制B16细胞增殖分析方法如下:

利用CCK8法测定不同浓度的RGD嵌合体肽黑色素瘤B16细胞在加入多肽12 h时,细胞增殖受到明显抑制,随着多肽浓度增加,细胞抑制率逐渐增加,呈现浓度依赖性。多肽24 h作用后的细胞抑制率比12 h明显增加,表明多肽对B16细胞的作用体现时效性,与对照组比较,P<0.05。

[0026] 由附图3和附图4(图中n=4, $\bar{x} \pm s$)可以看出RGD-T-La(FS)对B16细胞的抑制率在24 h的最大抑制率达到84%,且多肽样品作用24 h后在20 μg/mL时对B16细胞的抑制率比其他多肽组高;RGD-T-La(FS)与RGD-T-La(S)相比抑制B16细胞的作用更明显。

[0027] RGD嵌合体肽对B16 细胞黑色素形成的影响分析：

如附图5中T-La (S) 和RGD-T-La (S)、附图6中T-La (FS) 和RGD-T-La (FS) 所示与对照组相比,随着多肽浓度的增加,整体黑色素含量呈下降趋势,RGD-T-La (S) 在50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 时具有明显抑制作用,黑色素含量下降到70.4%和66.3%,RGD-T-La (FS) 在5 $\mu\text{g/mL}$ 时有明显抑制作用,黑色素含量下降到76.5%,在100 $\mu\text{g/mL}$ 时黑色素含量下降到66.3%,低于T-La (S) 的黑色素含量,T-La (S) 处理的B16细胞黑色素含量虽然也有下降,但各浓度间差异不明显。这表明RGD嵌合体肽对黑色素合成含量有显著的抑制作用。

[0028] RGD嵌合体肽对B16 细胞酪氨酸酶活性的影响分析：

如附图8中T-La (FS) 和RGD-T-La (FS) 和附图7中T-La (S) 和RGD-T-La (S) 所示,与对照组相比,不同浓度的间多肽对B16细胞中酪氨酸酶活性具有明显的抑制作用,RGD-T-La (S) 在10 $\mu\text{g/mL}$ 时下降趋势明显,在100 $\mu\text{g/mL}$ 时酪氨酸酶活性降到49.2%,对酪氨酸酶活性的抑制率要高于T-La (S) 组(附图7所示),RGD-T-La (FS) 同样在10 $\mu\text{g/mL}$ 时下降趋势明显,在100 $\mu\text{g/mL}$ 时酪氨酸酶活性降到55.9%,在低浓度时对酪氨酸酶活性的抑制率要高于T-La (FS) 组,高浓度多肽作用组酪氨酸酶活性抑制率要低于T-La (FS) 组(如附图8所示)。

[0029] RGD嵌合体肽对B16细胞凋亡相关蛋白表达的影响分析：

结果如附图9、附图10所示,RGD-T-La (FS) 随浓度升高,caspase 3、Bax、caspase9蛋白表达水平相应升高;Bcl-2蛋白表达量降低,其中A .T-La (FS) 10 $\mu\text{g/mL}$ 组 B. RGD-T-La (FS) 10 $\mu\text{g/mL}$ C. T-La (FS) 50 $\mu\text{g/mL}$ D. RGD-T-La (FS) 50 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0030] 本申请方案通过牛蛙皮肤cDNA文库中筛选的Temporin-La (T-La) 抗肿瘤肽,通过检测发现T-La具有一定的抗肿瘤活性和轻微溶血性。为提高其对肿瘤细胞的靶向性,对牛蛙抗肿瘤肽T-La氨基酸进行分子改造,合成新的抗肿瘤肽T-La (FS),并对改造后的多肽T-La (FS) 与RGD偶联,合成对肿瘤细胞具有靶向作用的抗肿瘤肽RGD-T-La (FS),通过对其生物信息学进行分析及生物活性检测,前期研究证明RGD-T-La (FS) 对肿瘤细胞具有较强的抑制作用。本申请方案对探索改造过的RGD嵌合体肽对黑色素瘤B16细胞增殖和凋亡机制做进一步研究,为临床上抗肿瘤药物的开发与应用奠定科学基础。

[0031] 应当理解的是,本发明的上述具体实施方式仅仅用于示例性说明或解释本发明的原理,而不构成对本发明的限制。因此,在不偏离本发明的精神和范围的情况下所做的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。此外,本发明所附权利要求旨在涵盖落入所附权利要求范围和边界、或者这种范围和边界的等同形式内的全部变化和修改例。

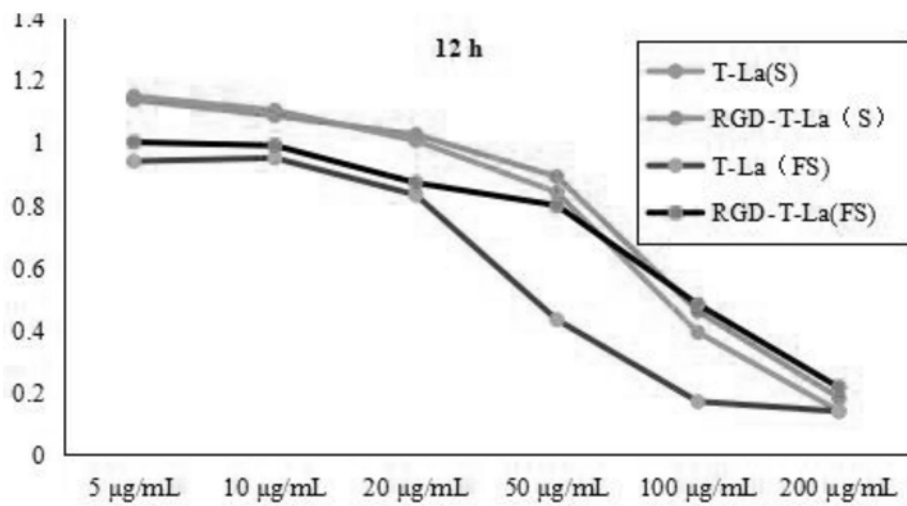


图1

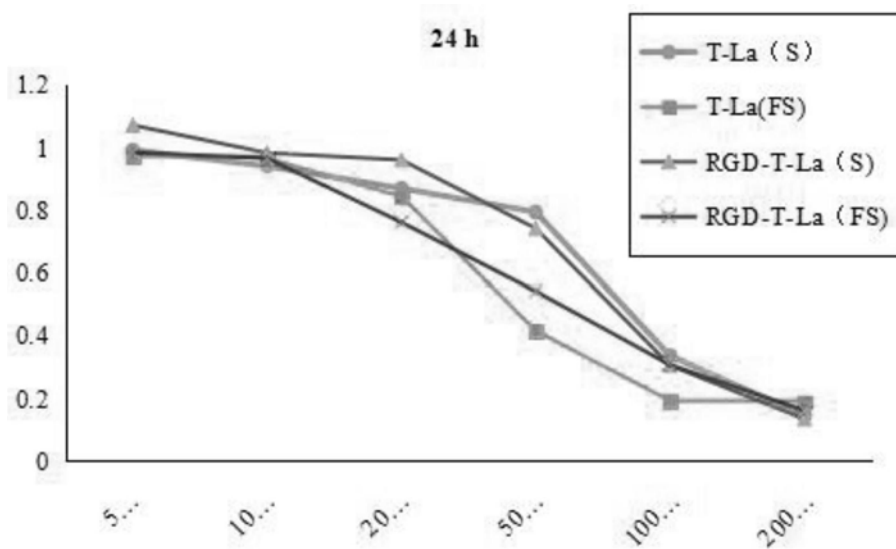


图2

组别 浓度 $\mu\text{g/ml}$	T-La S	T-La FS	RGD-T-La S	RGD-T-La FS
0	1.06 ± 0.04	1.02 ± 0.04	1.16 ± 0.04	1.19 ± 0.04
5	1.15 ± 0.06	$0.94 \pm 0.02^*$	1.14 ± 0.06	$1.01 \pm 0.06^*$
10	1.11 ± 0.07	$0.95 \pm 0.03^*$	$1.09 \pm 0.04^*$	$0.99 \pm 0.09^*$
20	$1.01 \pm 0.01^*$	$0.83 \pm 0.06^*$	$1.03 \pm 0.11^*$	$0.87 \pm 0.04^*$
50	$0.84 \pm 0.05^*$	$0.43 \pm 0.03^*$	$0.89 \pm 0.14^*$	$0.80 \pm 0.07^*$
100	$0.39 \pm 0.05^*$	$0.17 \pm 0.03^*$	$0.46 \pm 0.08^*$	$0.48 \pm 0.07^*$
200	$0.14 \pm 0.01^*$	$0.14 \pm 0.01^*$	$0.18 \pm 0.01^*$	$0.21 \pm 0.08^*$

图3

组别 浓度 $\mu\text{g/ml}$	T-La S	T-La FS	RGD-T-La S	RGD-T-La FS
0	1.07 $\pm$ 0.07	1.08 $\pm$ 0.05	1.06 $\pm$ 0.03	1.08 $\pm$ 0.05
5	0.99 $\pm$ 0.02*	0.97 $\pm$ 0.09	1.07 $\pm$ 0.06	0.98 $\pm$ 0.03*
10	0.94 $\pm$ 0.03*	0.96 $\pm$ 0.05	0.98 $\pm$ 0.10*	0.96 $\pm$ 0.06*
20	0.87 $\pm$ 0.02*	0.84 $\pm$ 0.05*	0.96 $\pm$ 0.03*	0.76 $\pm$ 0.04*
50	0.79 $\pm$ 0.06*	0.42 $\pm$ 0.12*	0.74 $\pm$ 0.01*	0.54 $\pm$ 0.07*
100	0.34 $\pm$ 0.02*	0.19 $\pm$ 0.19*	0.31 $\pm$ 0.07*	0.31 $\pm$ 0.03*
200	0.15 $\pm$ 0.01*	0.19 $\pm$ 0.17*	0.13 $\pm$ 0.02*	0.16 $\pm$ 0.01*

图4

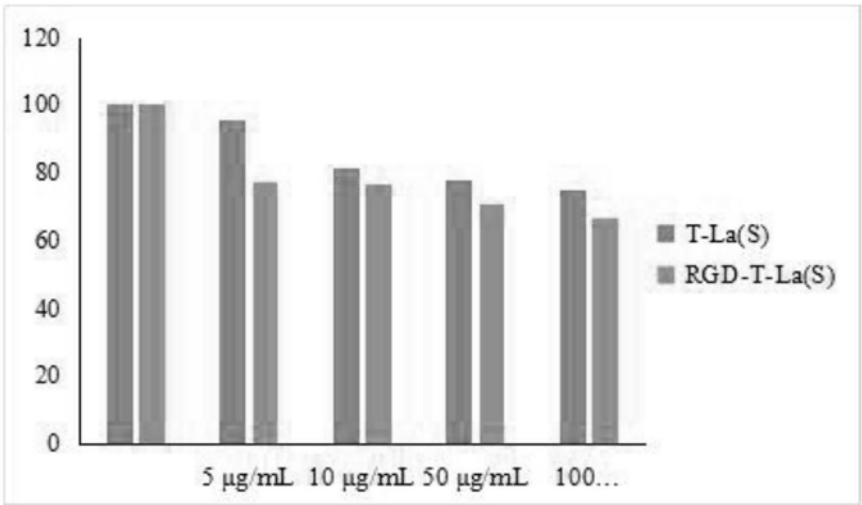


图5

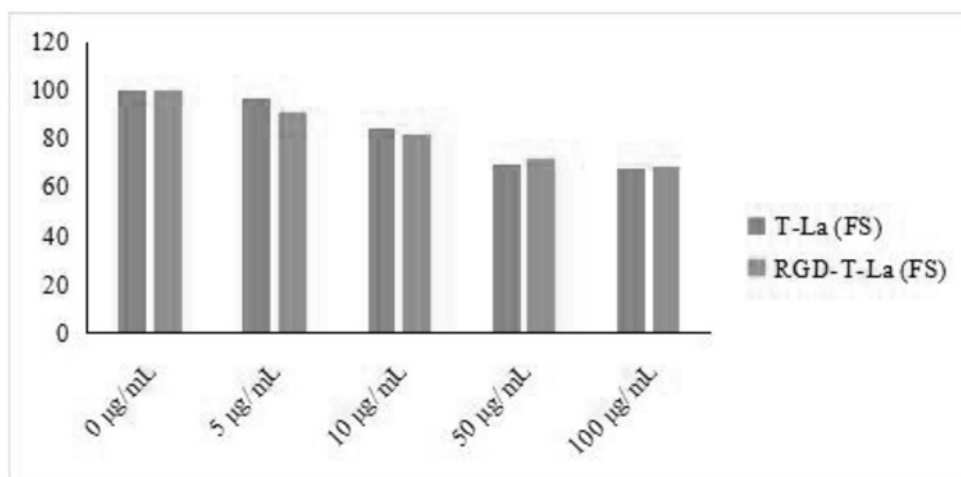


图6

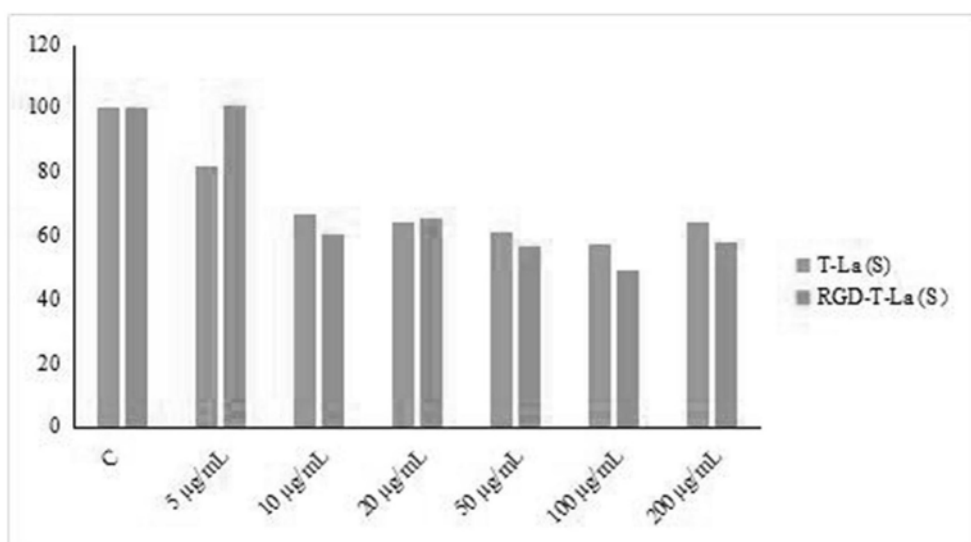


图7

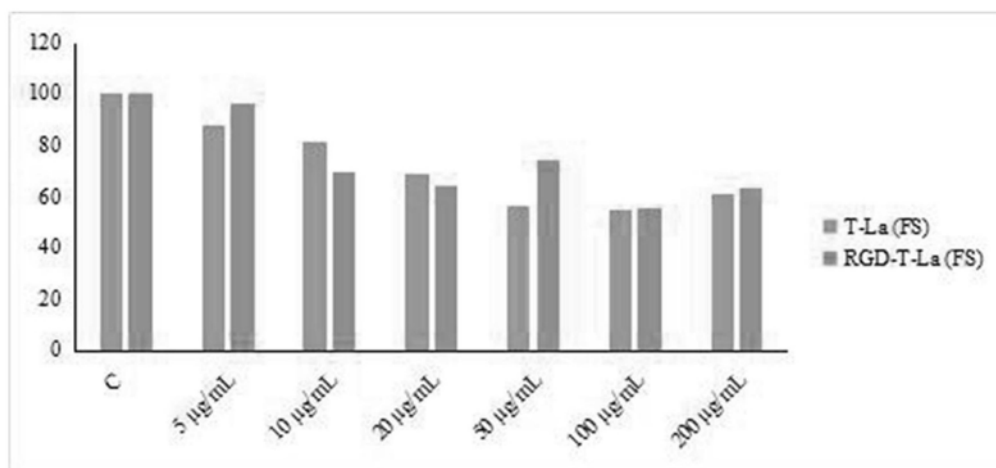


图8

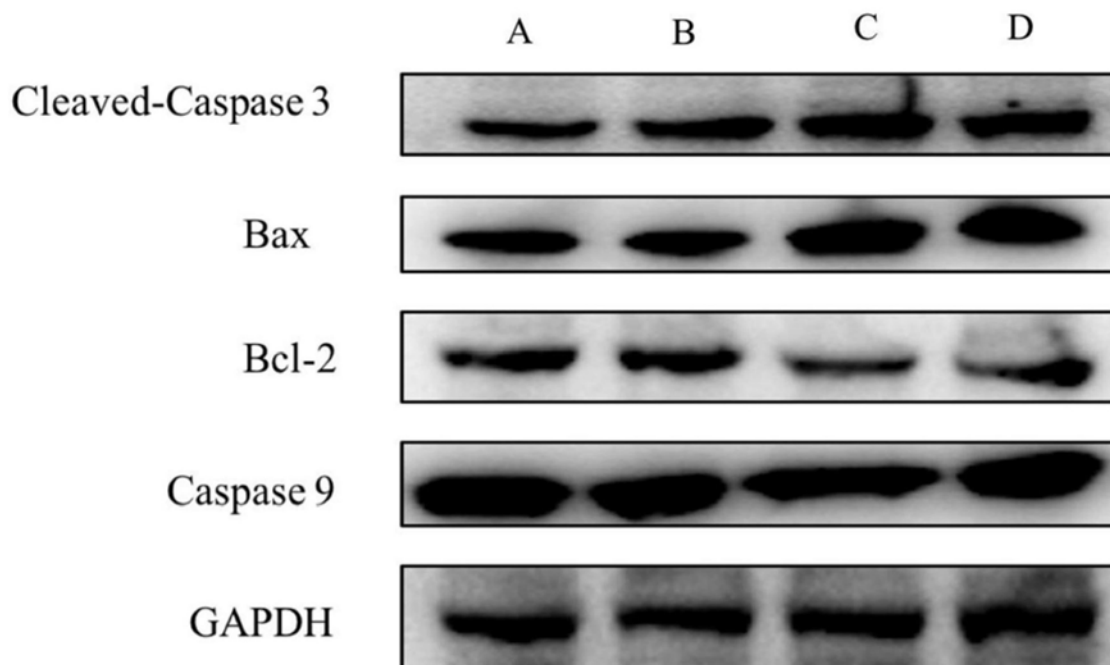


图9

组别	T-La (FS) 10	RGD-T_La(FS) 10	T-La (FS) 50	RGD-T_La(FS) 50
caspase 3	1.93	2.33	2.41	2.31
Bax	2.02	2.05	2.78	2.9
Bcl-2	1.68	1.68	1.45	1.39
caspase 9	4.55	3.95	5.28	4.46

图10

专利名称(译)	一种在牛蛙中提取抗肿瘤多肽及分析方法		
公开(公告)号	CN111349144A	公开(公告)日	2020-06-30
申请号	CN201811581394.9	申请日	2018-12-24
[标]申请(专利权)人(译)	天津农学院		
申请(专利权)人(译)	天津农学院		
当前申请(专利权)人(译)	天津农学院		
[标]发明人	赵瑞利 金天明 杨琳燕 姜轩 马吉飞 李留安 秦顺义 李存 付超 胡烨		
发明人	赵瑞利 金天明 杨琳燕 姜轩 马吉飞 李留安 秦顺义 李存 付超 胡烨		
IPC分类号	C07K7/06 C07K1/14 G01N33/53 G01N33/68		
代理人(译)	王璐		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及生物提取技术领域，尤其涉及一种在牛蛙中提取抗肿瘤多肽及分析方法。本申请方案通过牛蛙皮肤cDNA文库中筛选的Temporin-La (T-La) 抗肿瘤肽，通过检测发现T-La具有一定的抗肿瘤活性和轻微溶血性。为提高其对肿瘤细胞的靶向性，对牛蛙抗肿瘤肽T-La氨基酸进行分子改造，合成新的抗肿瘤肽T-La (FS)，并对改造后的多肽T-La(FS)与RGD偶联，合成对肿瘤细胞具有靶向作用的抗肿瘤肽RGD-T-La (FS)，通过对其生物信息学进行分析及生物活性检测，前期研究证明RGD-T-La (FS) 对肿瘤细胞具有较强的抑制作用。

